بررسی ژن های بیماری زای stx_1 ، stx_2 ، eae A و hly با روش Multiplex PCR در سویه های E.coli O157:H7 جداسازی شده از کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد در شهرستان مرودشت

محمد کارگر*[۱]، مریم همایون[۲]، رامین یعقوبی[۳]، آرا مانوکیانس[۴]

۱. PhD میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
۲. MSc میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
۳. PhD ویروس شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و مرکز تحقیقات پیوند اعضاء ، دانشگاه علوم پزشکی فارس
۴. دکترای علوم آزمایشگاهی ، بیمارستان شهید مطهری مرودشت ، دانشگاه علوم پزشکی فارس

* **نشانی برای مکاتبه:** جهرم ، دانشگاه آزاد اسلامی ، گروه میکروبیولوژی ، تلفن : ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳ ، Karagarmicro418@yahoo.com
دریافت مقاله: شهریور هشتاد و هفت پذیرش برای چاپ: آبان هشتاد و هفت

چکیده

سابقه و هدف : *سویه های انتروهموراژیک E.coli O157:H7 یکی از مهم ترین پاتوژن های روده ای هستند که بیماری هایی مانند کولیت هموراژیک ، سندرم اورمی همولیتیک و به ویژه نارسایی های حاد کلیوی در کودکان را ایجاد می کنند. هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی ژن های بیماری زای stx_1 ، stx_2 ، eae A و hly باکتری E.coli O157:H7 در کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال شدید در شهرستان مرودشت می باشد.*

روش کار: *نمونه های مدفوع کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال در ۴ منطقه شهرستان مرودشت در طی یک سال جمع آوری و پس از غنی سازی در دو محیط ECB و TSB و بررسی تخمیر سوربیتول بر روی محیط CT-SMAC ، باکتری های سوربیتول منفی با استفاده از تست های اختصاصی بیوشیمیایی به عنوان E.coli تعیین هویت شدند. سپس فعالیت بتاگلوکورونیدازی سویه ها به وسیله محیط کروموژن اختصاصی O157 بررسی و جداسازی باکتری E.coli O157:H7 با استفاده از آنتی سرم اختصاصی تأئید گردید. در نهایت نیز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی وجود ژن های بیماری زای stx_1 ، stx_2 ، eae A و hly با روش Multiplex PCR در سویه های E.coli O157:H7 مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته ها : *از ۶۱۵ کودک مورد بررسی (۲۷۸دختر و ۳۳۷پسر) ، از ۷ کودک باکتری E.coli O157:H7 جدا سازی گردید (فراوانی ۱/۱۴٪). اختلاف معنی داری بین جداسازی باکتری از گروه سنی ۱۸ تا ۲۳ ماه با سایر گروه های سنی مشاهده شد (P= ۰/۰۰۴). از نمونه های مورد بررسی تنها در یک سویه جداسازی شده ، ژن های stx_1 و eae A (فراوانی ۰/۱۶٪) شناسایی گردید. اما ژن های stx_2 و hly در هیچ کدام از سویه های تأئید شده با آنتی سرم مشاهده نگردید.*

نتیجه گیری : *به دلیل شدت بیماری زایی ، دوز عفونی اندک و عدم بررسی روتین در آزمایشگاه های کلینیکی ، انجام مطالعات گسترده تر و ژنوتایپینگ باکتری E.coli O157:H7 در سایر مناطق کشور و برنامه ریزی مدون به منظور پیشگیری و کنترل آلودگی های ناشی از این باکتری پیشنهاد می گردد.*

واژگان کلیدی : ***اشریشیا کلی O157:H7 ، گاستروانتریت حاد ، ژن های بیماری زا ، Multiplex PCR***

مقدمه

سویه E.coli O157:H7 تولید کننده شیگا توکسین (STEC) یکی از باکتری های بیماری زای منتقل شونده از طریق مواد غذایی است. مهم ترین بیماری هایی که به وسیله این باکتری ایجاد می شوند شامل : اسهال خفیف ، کولیت خونریزی دهنده پورپورای ترومبوسیتوپنیک ، سندرم اورمی همولیتیک و مرگ همراه با بروز ناگهانی در تمام سنین است(۱ و ۲).سویه E.coli O157:H7 می تواند از طریق آب و غذای آلوده ، تماس فرد به فرد و از حیوانات به انسان منتقل شود. گاوسانان مخزن اصلی این باکتری هستند.

همچنین حیواناتی مانند گوسفند ، گوزن ، بز ، آهو ، خوک ، گربه ، سگ ، جوجه و غاز به عنوان مخزن شناخته شده اند. تا کنون هیچ گونه بیماری زایی ناشی از این باکتری در حیوانات یاد شده ، گزارش نشده است. اما امکان انتقال باکتری از حیوانات به انسان از راه مستقیم ، تماس با آب ، خاک و فضولات نشخوارکنندگان و مصرف مواد غذایی مانند شیر خام و پاستوریزه آلوده ، ماست ، پنیر ، همبرگر ، سوسیس ، گوشت چرخ شده ، ساندویج های گوشتی ، سبزیجات و آب میوه ها وجود دارد(۳ و ۴).

سویه E.coli O157:H7 توانایی تخمیر سوربیتول و فعالیت بتاگلوکورونیدازی را ندارد. بنابراین استفاده از یک محیط انتخابی مانند SMAC و انجام تست MUG می تواند به جداسازی اولیه باکتری از نمونه های مدفوع کمک کند(۵).

سویه های STEC دو سیتوتوکسین قوی به نام شیگا توکسین های ۱و۲ (Stx_1 و Stx_2) را تولید می کنند که ژن های آن توسط فاژ کد می شود. این توکسین ها دارای اثر سیتوپاتیک بر روی سلول های اپی تلیال روده ای هستند که در ایجاد اسهال خونی نقش دارد.

از دیگر عوامل بیماری زای این سویه ، پروتئینی به نام اینتیمین (intimin) است که مسئول اتصال باکتری به روده و ایجاد آسیب های خاصی به نام اتصال و محو شدن (attaching /effacing) و ساختارهای فنجانی شکل (cup like) در سلول های اپی تلیال روده می باشد.

به همین دلیل به ژن کد کننده این پروتئین eae (E.coli attaching and effacing) می گویند. همچنین انتروهمولیزین که به وسیله ژن hly کد می شود ، نیز از عوامل مؤثر بیماری زایی این سویه محسوب می شود(۱ ،۲ و ۶). با وجود این که ژن های کد کننده شیگا توکسین ها (stx_1 و stx_2) و ژن های eae A و hly مهم ترین ژن های بیماری زایی شناخته شده سویه های STEC هستند ، اما ارزیابی جداگانه این ژن ها با تکنیک PCR بسیار پر هزینه و زمان بر است. محققینی مانند Paton در سال ۱۹۹۷ در استرالیا (۷) ، Pradel و همکاران در سال ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ در فرانسه(۶) ، Osek در سال ۲۰۰۳ در لهستان (۲) ، Blanco و همکاران در سال ۲۰۰۳ در اسپانیا (۸) ، Mohsin و همکاران در سال ۲۰۰۵ در پاکستان (۹) و Garcia و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مکزیک(۱۰) با استفاده از روش Multiplex PCR پرایمرهای مختلفی را برای تشخیص این ژن ها پیشنهاد نمودند.

به دلیل بیماری زایی و دوز عفونی اندک ، سازمان بهداشت جهانی ، تأکید زیادی را بر پایش مستمر سویه های E.coli O157:H7 دارد. اما متأسفانه تا کنون در کشور ما به ویژه در مورد ارزیابی هم زمان ژن های بیماری زای این باکتری پژوهش های قابل توجهی انجام نشده است. هدف ما از این پژوهش ، ارزیابی میزان شیوع و فراوانی ژن های بیماری زای سویه های E.coli O157:H7 جدا شده از نمونه های کودکان زیر ۵ سال در شهرستان مرودشت می باشد.

روش کار

تعداد ۶۱۵ نمونه مدفوع از کودکان زیر ۵ سال بستری در بخش اطفال بیمارستان شهید مطهری و کودکان غیر بستری مراجعه کننده به آزمایشگاه های دکتر صحرایی و پاسکال شهرستان مرودشت از مهر ماه سال ۱۳۸۵ تا مهر ماه سال ۱۳۸۶ جمع آوری شد. نمونه ها به فاصله چند ساعت پس از جمع آوری مورد بررسی قرار گرفتند. در تمامی نمونه ها مشخصات مربوط به هر بیمار نیز در پرسشنامه تهیه شده ثبت گردید.

غنی سازی نمونه ها بر روی محیط های تریپتیکاز سوی براث (TSB ، Difco) و اشریشیا کلی براث (ECB ، Oxoid) واجد ۲۰mg/l نوبیوسین (sigma) در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت انجام گردید(۱۱).

تمام نمونه های مدفوع به طور مستقیم بر روی محیط سوربیتول مک کانکی آگار (SMAC ، Lab.M) حاوی ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر سفیکسیم (Oxoid) و ۲/۵ میلی گرم در لیتر تلوریت پتاسیم (Oxoid) کشت داده شدند. نمونه های غنی شده در دو محیط TSB و ECB نیز بر روی محیط CT-SMAC به طور جداگانه کشت داده شد و پس از ۲۴ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷°C ، کلنی های سوربیتول منفی خالص سازی گردید. به منظور ارزیابی تخمیر لاکتوز و تعیین هویت باکتری های جداسازی شده محیط های ویولت رد بایل آگار (VRBA ، Merck) و ائوزین متیلن بلو آگار (EMB ، Merck) مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی فعالیت بتاگلوکورونیدازی ، باکتری های تأئید شده به عنوان اشریشیاکلی بر روی محیط کرومو آگار اختصاصی O157 کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری گردید(۴).

به منظور تأئید نهایی کلنی های سوربیتول منفی و بتاگلوکورونیداز منفی ، از تست آگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی O157 (بهار افشان) استفاده گردید (۴).

استخراج DNA با استفاده از کیت DNP™ (شرکت سیناژن) انجام گردید. برای ردیابی همزمان ژن های بیماری زا ، از روش Multiplex PCR استفاده شد. در جدول ۱ توالی الیگونوکلئوتیدی چهار جفت پرایمر مورد استفاده برای ژن های هدف و اندازه محصولات تقویت شده نشان داده شده است. PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر حاوی (10 mM) Tris-HCL ، (3 mM) mgCl2 ، (0.2 mM) dNTPs ، (10Mm) KCl ، 20 Pmol از هر یک از پرایمرها ، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq و 4 µl DNA انجام شد. PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Techne) با شرایط: حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد ۳ دقیقه (Denaturation ابتدایی) ، حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه (Denaturation) ، حرارت ۵۸ درجه سانتیگراد ۴۰ ثانیه (Annealing) ، حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد ۹۰ ثانیه (Extension) و حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه (Extension نهایی) انجام شد. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ واجد اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز توسط دستگاه Transilluminator مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان کنترل مثبت از سویه 933J و به عنوان کنترل منفی از سویه E.coli K12 استفاده شد(۱۲ و ۱۳).

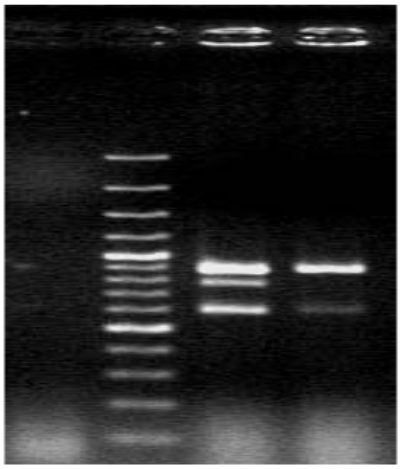
آنالیز نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS 13 ، آزمون مربع کای و آزمون دقیق فیشر انجام شد. مرز معنی دار روی $p<۰/۰۵$ قرار داده شد.

جدول۱ : توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای معرفی شده توسط Santaniello (۲۰۰۷)

اسم پرایمر	توالی الیگو نوکلئوتیدی (´۳→´۵)	اندازه محصول
stx_1-F	ACACTGGATGATCTCAGTGG	614bp
stx_1-R	CTGAATCCCCCTCCATTATG	
stx_2-F	CCATGACAACGGACAGCAGTT	779bp
stx_2-R	CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	
eaeA-F	GTGGCGAATACTGGCGAGACT	890bp
eaeA-R	CCCCATTCTTTTTCACCGTCG	
hlyA-F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	165bp
hlyA-R	CTTCACGTGACCATACATAT	

یافته ها

در این پژوهش تعداد ۶۱۵ نمونه مدفوع از کودکان زیر ۵ سال در شهرستان مرودشت مورد مطالعه قرار گرفت. گروه بندی سنی جمعیت مورد پژوهش به صورت گروه های ۲ ـ۰ ، ۵ ـ۳ ، ۸ ـ۶ ، ۱۱ـ ۹ ، ۱۷ـ۱۲ ، ۲۳ـ ۱۸ ، ۳۵ـ۲۴ ، ۴۷ـ۳۶ و ۶۰ـ۴۸ ماه در نظر گرفته شد تا توزیع فراوانی نمونه ها در کودکان زیر ۵ سال به تفکیک مشخص شوند. از مجموع ۲۷۸ نمونه تهیه شده از دختران (۴۵/۲۰٪) ، ۳ باکتری (۰/۴۹٪) و از مجموع ۳۳۷ نمونه تهیه شده از پسران (۵۴/۸۰٪) ، ۴ باکتری (۰/۶۵٪) جداسازی گردید. همچنین ، در مجموع ۱۸۲ نمونه (۲۹/۵۹٪) از بیماران بستری و ۴۳۳ نمونه (۷۰/۴۱٪) از بیماران غیر بستری جمع آوری گردید. تمامی سویه های E.coli O157:H7 جدا شده مربوط به کودکان زیر۲ سال (با میانگین سنی ۱۱/۷ ماه) و با فراوانی بیشتر (۸۵/۷۱٪) از کودکان غیر بستری بود. با استفاده از آزمون کای دو مشخص شد که بین گروه سنی و ایجاد بیماری رابطه معنا داری وجود دارد (p =۰/۰۰۴). به دلیل جمع آوری تصادفی نمونه ها ، توزیع فراوانی بیماران در فصول مختلف متفاوت بود. فراوانی باکتری های جداسازی شده در فصول بهار ، تابستان ، پاییز و زمستان به ترتیب ۰/۳۳ ، ۰/۱۶ ، ۰/۳۳ و ۰/۳۳ درصد بود. با استفاده از آزمون دقیق فیشر مشخص شد که هیچ رابطه معنا داری بین فصل نمونه گیری و ایجاد بیماری وجود ندارد. از ۸۹ نمونه (۱۴/۴۷٪) کلنی سوربیتول منفی در محیط CT-SMAC جداسازی شد که پس از کشت بر روی محیط های اختصاصی VRBA و EMB ، ۷۷ نمونه (۱۲/۵۲٪) به عنوان اشریشیاکلی تعیین هویت شدند. در مرحله بعد با استفاده از محیط کرومو آگار O157 ، ۳۲ نمونه (۵/۲۰٪) و در نهایت ۷ نمونه (۱/۱۴٪) با استفاده از آنتی سرم اختصاصی ، به عنوان باکتری E.coli O157:H7 تأئید گردید. در این پژوهش ژن های stx_1 و eaeA در یک سویه شناسایی شدند. در نمونه کنترل مثبت باندهای 614 bp ، 779 bp و 890 bp مشاهده شد که به ترتیب مربوط به ژن های stx_1 و stx_2 و eaeA بودند. تنها در یکی از سویه های مورد بررسی ، باند مربوط به ژن stx_1 در ناحیه 614 bp و باند مربوط به ژن eaeA در ناحیه 890 bp مشاهده گردید. اما ژن های stx_2 و hly در هیچ کدام از سویه های تأئید شده با آنتی سرم اختصاصی مشاهده نشد (شکل ۱).



۱ ۲ ۳ ۴

شکل۱: نمایش ژن های بیماری زای تعیین شده با روش Multiplex PCR توسط پرایمرهای اختصاصی بر روی ژل آگاروز. کنترل منفی (۱) ، مارکر 100 bp (۲) ، کنترل مثبت (۳) و نمونه مثبت دارای ژن های stx_1 و eae (۴)

بحث

بیماری اسهال در سطح جهان دومین علت مرگ محسوب می شود. سالانه حدود ۲۵ میلیون عفونت روده ای اتفاق می افتد و این عفونت ها به ویژه باعث مرگ و میر کودکان زیر ۵ سال و افراد مسن می شوند. حدود ۰/۶ تا ۲/۴٪ از موارد اسهال و ۱۵ تا ۳۶٪ از موارد اسهال خونی مربوط به E.coli O157:H7 هستند و این سویه یکی از عوامل عمده ایجاد کننده اسهال خونی و کولیت هموراژیک است (۹). در مورد فراوانی شیوع اشریشیاکلیO157 اطلاعات محدودی وجود دارد ، زیرا اغلب آزمایشگاه های تشخیص طبی به صورت روزمره این ارگانیسم را ردیابی نمی کنند و نتایج اغلب پژوهش های انجام شده نشان دهنده حضور موارد تک گیر باکتری می باشد (۱۴). اما در کشورهای توسعه یافته توجه بیشتری به این باکتری شده و تصویر نسبتا واضحی از شیوع آن وجود دارد. به عنوان نمونه بروز STEC در استرالیا ۱/۶٪ گزارش شده که این میزان در نمونه های مدفوع حاوی خون ۲/۵ برابر بیشتر بوده است. میزان شیوع STEC در سال ۱۹۹۷ در قاره اروپا ، در سال ۱۹۹۷ در امریکا ، در سال ۱۹۹۹ در ولز و در سال ۲۰۰۱ در آرژانتین به ترتیب کمتر از ۱ ، ۲/۷ ، ۸/۸ و ۱۰/۴ در هر ۱۰۰ ,۰۰۰ نفر جمعیت گزارش شده است (۹ ، ۱۵ و ۱۶).

میزان موارد تأئید شده آلودگی با باکتری E.coli O157:H7 در سال ۲۰۰۷ در اسکاتلند ۹ مورد و در سال ۲۰۰۸ در ویرجینیای امریکا ۲۵ مورد بوده است. همچنین در ۴۰ همه گیری (۲۱ مورد در میشیگان و ۱۹ مورد در اوهایو) در سال ۲۰۰۸ آلودگی با باکتری E.coli O157:H7 تأئید شده است(۱۷ و ۱۸).

بر خلاف شیوع کمتر بیماری های اسهالی در کشورهای توسعه یافته ، همچنان اسهال های باکتریایی یکی از مهم ترین بیماری های عفونی کشورهای در حال توسعه به شمار می آیند. البته در کشورهای در حال توسعه ، میزان شیوع E.coli O157:H7 کمتر گزارش می شود. دلیل این مسأله انجام بررسی های ناقص و محدود میزان شیوع و اپیدمیولوژی این باکتری است. به طور کلی در برخی از نواحی جغرافیایی و بعضی از گروه های سنی ، فراوانی شیوع این باکتری بالاتر از دیگر پاتوژن های روده ای می باشد. شیوع سویه های STEC در سال ۲۰۰۲ در هند در بیماران مبتلا به اسهال خونی۱/۴٪ و در بیماران دارای اسهال معمولی و بدون خون۰/۶٪ بوده است (۱۹). در گرجستان ۱۲ مورد آلودگی در سال ۲۰۰۸ به علت مصرف گوشت آلوده بوده است (۲۰). بر اساس اطلاعات و آمار مرکز بیماری های واگیر ، میزان موارد اسهال خونی در سال های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ در استان فارس به ترتیب ۱۲۶۴ و ۱۳۴۴ مورد و در شهرستان مرودشت به ترتیب ۴۰ و ۲۰ مورد بوده است. سازمان بهداشت جهانی ، به دلیل مخاطرات و امکان شیوع گسترده ، پایش بیمارستانی باکتری E.coli O157:H7 را در کشورهای در حال توسعه پیشنهاد نموده است. در این پژوهش به دلیل دارا بودن جمعیت بالا و بافت روستایی شهرستان مرودشت انتخاب گردید.

در ایران تمامی مطالعات مولکولی انجام شده بر روی این باکتری ، مربوط به مواد غذایی و نمونه های مدفوع حیوانات بوده است. همچنین پژوهش ها بر روی نمونه های کلینیکی تا حد تعیین سروتیپ با آنتی سرم (نهائی و همکاران ۱۳۸۶) و در مواردی نیز استفاده از کشت سلولی برای بررسی وروتوکسین های باکتری (اصلانی و همکاران ۱۹۹۸ و ۲۰۰۳) انجام شده است و تا کنون نقش ژن های بیماری زای stx_1 ، stx_2 ، eaeA و hly در ایجاد اسهال مورد ارزیابی قرار نگرفته است. استفاده از کشت سلولی علاوه بر طولانی بودن ، فاقد دقت لازم برای بررسی این توکسین ها است. به همین دلیل در این پژوهش ما برای شناسایی ژن های بیماری زای stx_1 ، stx_2 ، eaeA و hly باکتری های E.coli O157:H7 جدا شده از نمونه های مدفوع از روش Multiplex PCR استفاده نمودیم(۱۴، ۲۱ و ۲۲).

در پژوهش Mohsin و همکاران در پاکستان در سال ۲۰۰۵ ، از میان ۲۰۰ کودک مورد بررسی با Multiplex PCR ، در مجموع ۲۲ نفر (۱۱٪) دارای یک یا هر دو ژن شیگا توکسین بودند ، به طوری که فراوانی بیماران دارای ژن های stx_1 و stx_2 با هم (۵۷/۱٪) گزارش گردید. ژن های eae و hly نیز به ترتیب با فراوانی ۴۲/۸٪ و ۲۱/۴٪ گزارش گردید(۹).

در بررسی Garcia و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در مکزیک ، از ۲۲ سویه STEC جداسازی شده از بیماران مبتلا به اسهال ، اکثر سویه ها یا ژن stx_2 و یا ترکیبی از ژن های stx_1 و eaeA را داشته اند ، به طوری که ۹ سویه ژن stx_2 ، ۹ سویه ژن های stx_1- eaeA ، ۳ سویه ژن stx_1 و ۱ سویه هم ژن های stx_1- eaeA- hlyA را نشان دادند(۱۰).

کارگر و همکاران در سال ۱۳۸۴ در جهرم از روش PCR برای ردیابی شیگا توکسین استفاده کردند که از ۱۷ نمونه مثبت با آنتی سرم تنها در یک سویه ژن شیگا توکسین stx_2 را مشاهده نمودند(۴).

در پژوهش ما نتایج Multiplex PCR بر روی نمونه های مثبت با آنتی سرم ، نشان دهنده وجود ژن های stx_1 و eae تنها در یکی از نمونه های مثبت (۱۴/۲۹٪) به صورت هم زمان بود و ۶ نمونه مثبت دیگر (۸۵/۷۱٪) فاقد این دو ژن بودند. این در حالی است که هیچ یک از ۷ نمونه مثبت با آنتی سرم O157 ژن های stx_2 و hly را نشان ندادند. در نیجریه نیز Moses و همکاران در بررسی سال ۲۰۰۶ ، از ۱۲ سویه اشریشیا کلی سوربیتول منفی جدا شده از نمونه های مدفوع انسان ، ۱۰ مورد را به عنوان سروتیپ E.coli O157 شناسایی نمودند. همچنین ۳ مورد از باکتری های جداسازی شده از مدفوع انسان که با تست سرولوژی به عنوان O157 تأئید شده بود ، توانایی تخمیر سوربیتول را داشت(۵). به همین دلیل ارزیابی سویه های سوربیتول مثبت باکتری E.coli O157:H7 نیز در پژوهش های بعدی پیشنهاد می گردد. همچنین ارزیابی ژن های بیماری زا و مقایسه ژنوتایپینگ سویه های جدا شده از مواد غذایی با نمونه های کلینیکی در سایر مناطق کشور توصیه می شود.

نتیجه گیری

به دلیل بیماری زایی ، مقاومت آنتی بیوتیکی و دوز اندک عفونی باکتری E.coli O157:H7 ، ضرورت پایش مستمر تمامی کودکان بستری در بیمارستان به ویژه مبتلایان به اسهال خونی وجود دارد. همچنین ارزیابی دقیق تر فیزیولوژی ، متابولیسم و ژنتیک باکتری به فهم بهتر بیماری زایی آن کمک می نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی جهرم به دلیل حمایت های اجرایی و همچنین از مدیریت محترم آزمایشگاه تشخیص طبی دکتر صحرایی مرودشت به دلیل همکاری در اجرای این پژوهش اعلام می دارند.

REFERENCES

1. Li F, Zhao C, Zhang W, Cui S, Meng J, Wu J, et al. Use of Ramification Amplification Assay for Detection of Escherichia coli O157:H7 and Other Escherichia coli Shiga Toxin- Producing Strains. J Clin Microbiol; 2005; 43; 6086 -6090.

2. Osek J. Development of a Multiplex PCR Approach for the Identification of Shiga-Toxin Producing Escherichia coli Strains and their Major Virulence Factor Genes. Journal of Applied Microbiology; 2003; 95; 1217-1225.

3. Bidet P, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Brahimi N, Courroux C, Grimont P, et al. Characterization of Escherichia coli O157:H7 Isolates Causing Haemolytic Uraemic Syndrome in France. Journal Medical Microbiology; 2005; 54; 71-75.

۴. کارگر محمد، حیدری سوسن، عباسیان فیروز و شکرفروش شهرام. ارزیابی روش های مختلف غنی سازی ، میزان شیوع و مقاومت آنتی بیـوتیکی Escherichia coli O157:H7 در شیر خام گاوهای شهرستان جهرم. فصلنامه بیماری های عفونی گرمسیری پاییز ۱۳۸۵، سال یازدهم: شماره ۳۴ صفحات ۷ تا ۱۱.

5. Moses AE, Egwu GO, Ameh JA. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Escherichia coli O157 and Non-O157 Serogroups Isolated from Human , Animals , Dairy Products and Water in Borno and Adamawa States , Nigeria. Res J Medicine & Med Sci; 2006; 1; 96-103.

6. Pradel N, Liverlli V, Champs CD, Palcoun J, Reynaud A, Scheutz F , et al. Prevalence and Characterization of Shiga-Toxin Producing Escherichia coli Isolated from Cattle, Food, and Children During a One-Year Prospective Study in France. J Clin Microbiol; 2000; 38; 1023-1031.

7. Paton AW, Paton JC. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic Escherichia coli by Using Multiplex PCR Assay for stx_1, stx_2, eaeA , Enterrohemorrhagic Escherichia coli hlyA , rfb_{O111} , rfb_{O157}. J Clin Microbiol; 1998; 36; 598-602.

8. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, et al. Serotypes , Virulance Genes , and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin) - Producing Escherichia coli Isolates from Healthy Sheep in Spain. J Clin Microbiol; 2003; 41; 1351-1356.

9. Mohsin M, Hussain A, Butt MA, Bashir S, Tariq A, Babar S, et al. Prevalence of Shiga Toxin- Producing Escherichia coli in Diarrheal Patients in Faisalabad Region of Pakistan as Determined by Multiplex PCR. J Infect Developing Countries; 2007; 1; 164-169.

10. Estrada-Garcia T, Cerna JF, Paheco-Gil L, Velazquez RF, Ochoa TJ, Torres J, Dupont H L. Drug-resistant Diarrheogenic Escherichia coli , Mexico . Emerging Infectious Disease; 2005; 11; 1306- 1308.

11. Hepburn NF, Macrae M, Johnston M, Mooney J, Ogden ID. Optimizing Enrichment Conditions for the Isolation of Escherichia coli O157 in Soils by Immunomagnetic Separation. Letters in Applied Microbiology; 2002; 34 ; 365-369.

12. Santaniello A, Gargiulo A, Borrelli L, Dipineto L, Cuomo A , Sensale M , et al. Survey of Shiga-Toxin Producing Escherichia coli in Urban Pigeons (Columba Livia) in the City of Napoli, Italy. Ital J Anim Sci; 2007; 6 ; 313-316.

13. Kim J, Kim S, Kwon N, Bae W, Lim J, Koo H, et al. Isolation and Identification of Escherichia coli O157:H7 Using Different Detection Methods and Molecular Determination by Multiplex PCR and RAPD. J Vet Sci; 2005; 6; 7-9.

۱۴. نهائی محمد رضا، اکبری دیباور محمد، صادقی جاوید و نیکوش سولماز. بررسی و تعیین درصد اشریشیا کلی های انتروهموراژیک جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال حاد در مراکز درمانی تبریز. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران پاییز ۱۳۸۶، سال اول : شماره ۳ صفحات ۳۹ تا ۴۶.

15. Chalmers RM, Parry SM, Salmon RL, Smith RMM, Willshaw GA, Cheasty T. The Surveillance of Verocytotoxin-Producing Escherichia coli O157 in Wales, 1990 to 1998. Emerging Infectious Disease; 1999; 5; 566-569.

16. Rivas M, Caletti MG, Chines I, Refi SM, Roldan CD, Chillemi G, et al. Home-Prepared Hamburger and Sporadic Hemolytic Uremic Syndrome, Argentina. Emerging Infectious Disease; 2003; 9; 1184-1186.

17. Webster D, Cowden J, Locking M. An Outbreak of Escherichia coli O157 in Aberdeen, Scotland. Eurosurveillance; 2007; 12.

18. CDC. Multistate Outbraek of E. coli O157 Infection Michigan and Ohio. MMWR; 2008; Available from : http://www.cdc.gov/

19. Islam MA, Heuvelink AE, de Boer E, Sturm PD, Beumer RR, Zwietering MH, et al. Shiga-Toxin-Producing Escherichia coli Isolated From Patients with Diarrhoea in Bangladesh. J Medical Microbiology; 2007; 56; 380-385.

20. Chapman B. E. coli O157 Outbraek Linked to Barbecue Pit Restaurant in Moultrie, Georgia. International Food Safety Network Infosheet; 2008.; Available from : http://www.foodsafety.ksu.edu

21. Aslani MM, Badami N, Mahmoodi M, Bouzari S. Verotoxin-Producing Escherichia coli (VTEC) Infection in Randomly Selected Population of Ilam Province (Iran). Seand J Infect Dis; 1998; 30; 473-475.

22. Aslani MM, Bouzari S. An Epidemiological Study on Verotoxin-Producing Escherichia coli (VTEC) Infection Among Population of Northern Region of Iran (Mazandaran and Golestan Provinces). European Journal of Epidemiology; 2003; 18; 345-349.